

CHIMERA INSECTICIDAL PROTEIN OF BACILLUS THURINGIENSIS**Publication number:** JP63137684 (A)**Publication date:** 1988-06-09**Inventor(s):** NAKAMURA KEIKO; OITA KENJI; OSHIE KAZUYUKI; SHIMIZU MASATOSHI;
TAKADA YASUSHI; NAKAYAMA ISAMU; OKAWA HIDEO**Applicant(s):** SUMITOMO CHEMICAL CO**Classification:****- international:** C12N15/09; A01N63/00; C07K14/325; C12N1/00; C12N15/00; C12P21/02;
C12R1/19; C12N15/09; A01N63/00; C07K14/195; C12N1/00; C12N15/00;
C12P21/02; (IPC1-7): A01N63/00; C12N1/00; C12N15/00; C12P21/02; C12R1/19**- European:** C07K14/325**Application number:** JP19860283228 19861127**Priority number(s):** JP19860283228 19861127**Abstract of JP 63137684 (A)**

PURPOSE: To obtain a chimera insecticidal protein gene, by cleaving a gene capable of coding two species of insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* with a restriction enzyme and replacing the respective corresponding regions. **CONSTITUTION:** A gene capable of coding 125 KD insecticidal protein and 130 KD insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* IPL strain is cleaved with restriction enzymes KpnI and HindIII to provide respective three regions of base Nos. (1-2174), (2175-2744), (2745-3465) and (1-2174), (2175-2822) and (2823-3528) and the respective regions of base Nos. (1-2174) are then cleaved with EcoRI and EcoRV to afford three regions of base Nos. (1-994), (995-1567) and (1568-2174). Thereby the respective five regions are obtained.; The corresponding regions (one of the three or five regions) of both genes are replaced to construct a chimera insecticidal protein gene. A microorganism transformed with a gene expression plasmid containing the above- mentioned genes is cultivated to afford the aimed chimera insecticidal protein effective against diamondback moth (*Plutella xylostella*) and *Prodenia litura* (tobacco cutworm).

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-137684

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)6月9日

C 12 N 15/00
A 01 N 63/00
C 12 N 1/00

8412-4B

C-7144-4H

U-6712-4B ※審査請求 未請求 発明の数 4 (全22頁)

⑮ 発明の名称 バチラス・チュリンゲンシスのキメラ殺虫性蛋白

⑯ 特 願 昭61-283228

⑰ 出 願 昭61(1986)11月27日

⑱ 発 明 者 中 村 啓 子 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
内⑲ 発 明 者 大 江 田 憲 治 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
内⑳ 発 明 者 押 柄 和 幸 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
内㉑ 発 明 者 清 水 将 年 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
内

㉒ 出 願 人 住友化学工業株式会社 大阪府大阪市東区北浜5丁目15番地

㉓ 代 理 人 弁理士 諸石 光 熙 外1名

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

バチラス・チュリンゲンシスのキメラ殺虫性蛋白

2. 特許請求の範囲

(1) バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ I P L 株の2種の殺虫性蛋白、125キログルトン(KD)殺虫性蛋白及び130キログルトン(KD)殺虫性蛋白をコードする遺伝子を制限酵素 EcoRI, EcoRV, KpnI, HindIII で切断して得た各5領域(塩基番号(1-994)(995-1567)(1568-2174)(2175-2744)(2745-3465)及び(1-994)(995-1567)(1568-2174)(2175-2822)(2823-3528))のそれぞれの相当する領域を置き換えることにより構築したキメラ殺虫性蛋白遺伝子およびこれを含むDNA

(2) バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ I P L 株の2種の殺虫性蛋白、125KD殺虫性蛋白及び130KD殺虫性蛋白をコードする遺伝子を制限酵素 KpnI, HindIII で切断して得た各3

領域(塩基番号(1-2174)(2175-2744)(2745-346

5)及び(1-2174)(2175-2822)(2823-3528))のそれぞれの相当する領域を置き換えることにより構築した特許請求の範囲第1項記載のキメラ殺虫性蛋白遺伝子およびこれを含むDNA

(3) バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ I P L 株の2種の殺虫性蛋白、125KD殺虫性蛋白及び130KD殺虫性蛋白をコードする遺伝子を制限酵素 EcoRI, EcoRV, KpnI, HindIII で切断して得た各5領域(塩基番号(1-994)(995-1567)(1568-2174)(2175-2744)(2745-3465)及び(1-994)(995-1567)(1568-2174)(2175-2822)(2823-3528))のそれぞれの相当する領域を置き換えることにより構築したキメラ殺虫性蛋白遺伝子を含みこれを微生物体内で発現させる発現プラスミド

(4) pAAC1, pACC1, pACA1, pCCA1, pCAA1, pCAC1, pACCA1若しくはpCACA3と命名した特許請求の範囲第3項記載の発現プラスミド

(5) バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ I P L 株の2種の殺虫性蛋白、125KD殺虫

性蛋白及び130KD殺虫性蛋白をコードする遺伝子を制限酵素EcoRI, EcoRV, KpnI, HindⅢで切断して得た各5領域(塩基番号(1-994)(995-1567)(1568-2174)(2175-2744)(2745-3465)及び(1-994)(995-1567)(1568-2174)(2175-2822)(2823-3528))のそれぞれの相当する領域を置き換えることにより構築したキメラ殺虫性蛋白遺伝子を含みこれを微生物体内で発現させる発現プラスミドにより形質転換されキメラ殺虫性蛋白を生産する微生物

(6) pAAC1, pACC1, pACA1, pCCA1, pCAA1, pCAC1, pACCA1, 若しくはpCACA3と命名した発現プラスミドを保持する特許請求の範囲第5項記載の微生物

(7) バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ IPL 株の2種の殺虫性蛋白、125KD殺虫性蛋白及び130KD殺虫性蛋白をコードする遺伝子を制限酵素EcoRI, EcoRV, KpnI, HindⅢで切断して得た各5領域(塩基番号(1-994)(995-1567)(1568-2174)(2175-2744)(2745-3465)及び(1-994)(995-1567)(1568-2174)(2175-2822)(2823-352

8)のそれぞれの相当する領域を置き換えることにより構築したキメラ殺虫性蛋白遺伝子を含みこれを微生物体内で発現させる発現プラスミドにより形質転換されキメラ殺虫性蛋白を生産する微生物

(従来の技術)

バチラス・チュリンゲンシスの各種菌株は、孢子形成期に殺虫性蛋白からなる1~2μmにおよぶ結晶を形成し、この結晶蛋白を摂取した昆虫は、摂食活動を停止し、腸管破裂等ののち、死に至ることが知られている。バチラス・チュリンゲンシス株は、鞭毛抗原やエステラーゼ活性などにより29亜種に分類されており、各々の菌株は特異的、かつそれぞれ異なる殺虫活性を示す。各種菌株の内から防除目的の害虫に対して最も有効な菌株を選定し、それを培養することによって殺虫性蛋白を作らせ、菌体または菌体を含む培養液にタルク等を混合することにより製剤を作製し、それを殺虫剤として用いる。

(発明の目的)

本発明者らは、鱗翅目昆虫のなかでも野菜類の主要害虫であるコナガおよびハモンヨトウに対

8))のそれぞれの相当する領域を置き換えることにより構築したキメラ殺虫性蛋白遺伝子を含みこれを微生物体内で発現させる発現プラスミドにより形質転換されキメラ殺虫性蛋白を生産する微生物を培養することを特徴とするキメラ殺虫性蛋白の製造方法

(8) pAAC1, pACC1, pACA1, pCCA1, pCAA1, pCAC1, pACCA1, 若しくはpCACA3と命名した発現プラスミドを保持する微生物を培養することを特徴とする特許請求の範囲第7項記載の製造方法

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、鱗翅目幼虫であるコナガおよびハモンヨトウに対し、殺虫活性を示すバチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ IPL 株の2種の殺虫性蛋白遺伝子から構築したキメラ殺虫性蛋白遺伝子、該遺伝子を含みこれを大腸菌等の微生物菌体内で発現させる発現プラスミド、該プラスミドを保持し、バチラス・チュリンゲンシスのキメ

ル殺虫性蛋白を生産する微生物菌株、および該微生物を培養することを特徴とするキメラ殺虫性蛋白の製造方法に関する。

(問題解決の手段)

本発明者らは、コナガおよびハモンヨトウに対し殺虫活性を示すバチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ IPL 株のプラスミドDNAから殺虫性蛋白をコードする遺伝子をクローン化した後同遺伝子の構造遺伝子部分の3465塩基の全配列を決定し、殺虫性蛋白(以下、125KD殺虫性蛋白と呼ぶ)の1次構造を解明した(特願昭 60-242528)。この125KD殺虫性蛋白の遺伝子を各種の発現ベクターに接続し微生物へ導入することにより125KD殺虫性蛋白を生産する微生物を製造し、この微生物を培養することにより同蛋白を大量に生産する製造方法を完成した(特願昭 61-024563)。

さらに、本発明者らは、バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ IPL 株の染色体DNAから上述の125KD殺虫性蛋白遺伝子と異なる殺虫性蛋白

白遺伝子をクローン化した後、同遺伝子の構造遺伝子部分の全塩基配列を決定して殺虫性蛋白（以下、130KD殺虫性蛋白と呼ぶ）の1次構造を解明し、130KD殺虫性蛋白を大量に生産する製造方法を完成した（特願昭 61-193483）。

本発明者らは、バチラス・チューリンゲンシスの殺虫性蛋白遺伝子についてさらに研究を重ねた結果、従来のバチラス・チューリンゲンシス殺虫性蛋白とは異なる殺虫活性を有するキメラ殺虫性蛋白の製造を目的として、上記2種類の殺虫性蛋白遺伝子からキメラ殺虫性蛋白遺伝子を構築し、これらのキメラ殺虫性蛋白遺伝子を微生物菌体内で発現させる発現用プラスミド及び核プラスミドを保持し該キメラ殺虫性蛋白を生産する微生物を製造することに成功し、この微生物を培養することにより殺虫活性を有するキメラ殺虫性蛋白を大量に生産する製造方法を完成した。

（発明の構成）

本発明のキメラ殺虫性蛋白遺伝子は、殺虫性蛋白をコードしている領域の特定の部分を他の殺虫

性蛋白遺伝子の相当する領域で置換することにより製造することができる。その例として、バチラス・チューリンゲンシス・アイザワイ I P L 株の 125KD殺虫性蛋白遺伝子を制限酵素 *Kpn*I, *Hind*III で切断することにより得られた、塩基番号1番目から2174番目までのDNA領域（A₁）、2175番目から2744番目までのDNA領域（A₂）あるいは2745番目から3465番目までのDNA領域（A₃）を、同株の130KD殺虫性蛋白遺伝子の相当する領域C₁（1-2174）、C₂（2175-2822）、C₃（2823-3528）に置き換えることにより製造したキメラ殺虫性蛋白遺伝子6種（AAC, ACA, ACC, CCA, CAA, CAC, と呼ぶ）を挙げるができる。更に、殺虫性蛋白遺伝子のA₁ およびC₁ に相当するDNA領域を制限酵素 *Eco*RI で切断して塩基番号1番目から994番目までのDNA領域（A₁₁、或いはC₁₁）と995番目から2174番目までのDNA領域（A₁₂、或いはC₁₂）の2領域に分けることにより125KD および130KD 殺虫性蛋白遺伝子を各々4領域に分け、125KD殺虫性蛋白遺伝子（A₁₁, A₁₂, A₂₁, A₂₂）

と130KD殺虫性蛋白遺伝子（C₁₁, C₁₂, C₂₁, C₂₂）のそれぞれの相当領域を置き換えることにより製造したキメラ殺虫性蛋白遺伝子を挙げるができる。本発明のキメラ殺虫性蛋白遺伝子は、例えば、バチラス・チューリンゲンシス・アイザワイ I P L 株由来の125KD殺虫性蛋白遺伝子を含むプラスミドpTB1（特願昭60-242528）及び130KD殺虫性蛋白遺伝子を含むプラスミドpKC6（特願昭61-024563）からそれぞれ必要部分を分離し、組合せを変えてつなぎ合わせるにより製造することができる。

本発明のキメラ殺虫性蛋白遺伝子の各領域の遺伝子の構成を第1図および第2図に示した。

遺伝子組換え技術によれば基本となるDNAの特定の部位に、該DNAがコードするものの基本的な特性を変化させることなく、あるいはその特性を改善するように、人為的に変異を起こすことができる。本発明により提供される、天然の塩基配列を有する遺伝子DNAあるいは天然のものは異なる塩基配列を有する遺伝子DNAに関して

も同様に人為的に挿入、欠失、置換を行なうことにより天然の遺伝子と同等あるいは改善された特性とすることが可能であり、本発明は、そのような変異遺伝子をも含むものである。

本発明のバチラス・チューリンゲンシスのキメラ殺虫性蛋白遺伝子を適当な発現ベクター、例えば *lac*プロモーターを保持する発現ベクターpUC18（ファルマシア社）、大腸菌の強力プロモーターである *lac*プロモーターとrrbBリボソームRNAのターミネーターを保持する発現ベクターpKK223-4（特願昭60-242528）、*trp*プロモーターを保持する発現ベクターpDR720（ファルマシア社）、誘導可能な発現ベクターpPL-Lambda（ファルマシア社）等に接続することにより大腸菌等の微生物菌体内でバチラス・チューリンゲンシスのキメラ殺虫性蛋白を生産させる発現ベクターを構築することができる。

本発明のキメラ殺虫性蛋白遺伝子を保持する発現ベクターを大腸菌（例えば、大腸菌JM103株（ファルマシア社））等の宿主微生物へ導入する

ことにより菌体内で殺虫活性の高いキメラ殺虫性蛋白を生産する微生物を得ることができる。

この様にして製造された形質転換微生物を適当な培地、条件で培養することにより殺虫活性を有するキメラ殺虫性蛋白を大量生産することが可能である。

培養後のキメラ殺虫性蛋白の単離は、例えば菌体を超音波で破碎し、遠心分離を行って、該キメラ殺虫性蛋白から成る凝集体を容易に濃縮、回収することにより行なうことができる。

また、大腸菌の宿主-ベクター系のみならず、枯草菌、酵母、シュウドモナス菌あるいは放線菌等の宿主-ベクター系も利用可能であり、それぞれの宿主-ベクター系の特徴を生かしたキメラ殺虫性蛋白の大量生産が行える。

以下に実施例を挙げ本発明を更に詳細に説明する。本発明は、以下の実施例のみに限定されるものではなく、本発明の技術分野に於ける通常の変更をすることができる。

実施例

1/50容の5M NaCl および2倍容のエタノールを加えて-80℃に10分間放置することによりDNAをエタノール沈澱した後、10,000rpmで10分間遠心してDNAを回収し、10μℓの滅菌蒸留水に懸濁した。以後のDNA断片の単離はこの方法で行った。

次に、pTBIを制限酵素 KpnI、PstI および HindIII で切断して、0.57 Kb の KpnI - HindIII DNA断片および0.73 Kb の HindIII - PstI DNA断片を単離した。6.7 Kb の KpnI - PstI 断片を a₁ 断片、0.57 Kb の KpnI - HindIII 断片を a₂ 断片、0.73 Kb の HindIII - PstI 断片を a₃ 断片と名付けた。

ステップ2 : 130KD 殺虫性蛋白発現プラスミド pKC6からのDNA断片の調製

ステップ1と同様の方法で、130 KD 殺虫性蛋白発現プラスミド pKC6を制限酵素 KpnI 及び PstI で切断して 6.7 Kb の KpnI - PstI DNA断片を単離し、c₁ 断片と名付けた。

次に、pKC6を制限酵素 KpnI、PstI 及び HindIII で切断して 0.65Kb の KpnI - HindIII DNA断片

1. キメラ殺虫性蛋白発現プラスミド pAACI, pACAI, pACC1, pCCA1, pCAC1, pCAAI の構築

ステップ1 : 125KD殺虫性蛋白発現プラスミド pTBIからのDNA断片の調製

約5μgの125KD殺虫性蛋白発現プラスミド pTBI (特願昭61-024563 記載の方法で製造) に各々20ユニットの制限酵素 KpnI、PstI を加え、200μℓのMed反応液 (10mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、50mM NaCl、10mM MgCl₂、1mM ジチオスレイトール) 中で37℃1時間反応後、反応液を0.1μg/μℓの臭化エチジウムを含む0.8%の低融点アガロースゲル (ベセスダ、リサーチ、ラボラトリー社製) に供し、アガロースゲル電気泳動を行った。泳動後、紫外線ランプ下で 6.7 Kb の KpnI - PstI DNA断片に相当するゲル部分を切り出してこれを65℃で5分間加熱した。融解したゲルに等容のTE緩衝液 (10mM トリス-塩酸 (pH 8.0)、0.5mM EDTA) を加え、TE緩衝液で飽和したフェノールを等容加えて攪拌した。10,000 rpm で5分間遠心し、上層を分取した後、

片及び0.73Kbの HindIII - PstI DNA断片をそれぞれ単離し、それぞれを c₂ 断片、c₃ 断片と名付けた。

ステップ3 : 発現プラスミド pAACI、pACAI、pACC1、pCCA1、pCAAI、pCAC1 の構築

ステップ1およびステップ2で調製した6種のDNA断片 a₁、a₂、a₃、c₁、c₂、c₃、各々100ng ずつを、① (a₁、a₂、c₃)、② (a₁、c₂、a₃)、③ (a₁、c₂、c₃)、④ (c₁、c₂、a₃)、⑤ (c₁、a₂、a₃)、⑥ (c₁、a₂、c₃) の組合わせで混合し、それぞれの混合液5μℓに対し40μℓのDNAライゲーションキット (宝酒造) A液および5μℓの同B液を加えて攪拌し、16℃30分間反応した。

その後、Cohen らの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110-2114) に従い、上記6種類の反応混合液それぞれにより大腸菌 JM109 株 (ファルマシア社) を形質転換した。出現したアシビシリン耐性コロニーを培養し、Birnboim らの方法 (Nucleic Acid Res., 7, 1513-1523.) に従いプラス

ミFDNAを調製した。約100ngのプラスミFDNAに3ユニットのClaIあるいは3ユニットのPvuIIを加えてMed反応液中で37℃1時間反応し、0.8%アガロースゲル電気泳動で分析した。その結果、発現ベクターのtacプロモーターの下流にキメラ殺虫性蛋白遺伝子が接続したプラスミDの構造6種類をそれぞれ確認し、上記①～⑥の組合せから得られた発現プラスミDをそれぞれpAAC1, pACA1, pACC1, pCCA1, pCAA1, pCAC1と名付けた(第1図参照)。なお、各キメラ蛋白遺伝子は、各発現プラスミDを制限酵素BamHI及びPstIで切断することにより容易に単離することができる。

II. キメラ殺虫性蛋白発現プラスミDpCCA1, pACA3の構築

ステップ1: キメラ蛋白発現プラスミDpACA1からのDNA断片の調製

2μgのキメラ蛋白発現プラスミDpACA1に10ユニットの制限酵素BamHIを加え100μlのHigh反応液(10mMトリス塩酸(pH7.5), 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mMジチオスレイトール)中で37℃

らのDNA断片の調製

ステップ1と同様の方法で、キメラ蛋白発現プラスミDpCCA1を制限酵素BamHIで切断した後EcoRIで部分切断し、1.1KbのBamHI-EcoRI断片を単離してc₁₁断片と名付けた。

次に、pCCA1をEcoRIおよびEcoRVで切断して0.6KbのEcoRI-EcoRV断片を単離し、c₁₂断片とした。さらに、pCCA1を制限酵素BamHIおよびEcoRVで切断して6.4KbのEcoRV-BamHI断片を単離し、ca断片とした。

ステップ3: キメラ蛋白発現プラスミDpACA1, pACA3の構築

ステップ1およびステップ2で調製した5種類のDNA断片a₁₁, a₁₂, c₁₁, c₁₂, ca各々100ngずつを、①(a₁₁, c₁₂, ca)、②(c₁₁, a₁₂, ca)の組合せで混合してリガーゼ反応を行なった。それぞれの反応混液により大腸菌JM109株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性コロニー培養してプラスミFDNAを調製した。約100ngのプラスミFDNAに3ユニットのPvu

1時間反応後、100μlのフェノール・クロロホルム(1:1)混液を加えてフェノール抽出をおこなった。10,000rpmで5分間遠心し上層を分取後、2倍量のエタノールを加えて-80℃に10分間放置した。10,000rpmで10分間遠心してDNAを回収し乾固させた後、20μlの蒸留水に懸濁した。調製したDNA溶液に3ユニットの制限酵素EcoRIを加え50μlのMed反応液中で25℃5分間反応してDNAを部分切断した後、0.1μg/μlの臭化エチジウムを含む1%低融点アガロースゲルに供し、電気泳動を行った。泳動後、紫外線ランプ下で1.1KbのBamHI-EcoRI断片に相当するゲル部分を切り出して融解し、フェノール抽出、エタノール沈澱を行ってDNAを回収し、a₁₁断片と名付けた。

次に、pACA1をHigh反応液中で制限酵素EcoRIおよびEcoRVで切断した後、低融点アガロースゲル電気泳動を行って0.6KbのEcoRI-EcoRV断片を単離し、a₁₂断片とした。

ステップ2: キメラ蛋白発現プラスミDpCCA1か

IIを加えてMed反応液中で、あるいは3ユニットのEcoRVを加えてHigh反応液中でそれぞれ37℃1時間反応した後、0.8%アガロースゲル電気泳動で分析した。アガロースゲル電気泳動の結果から、発現ベクターのtacプロモーターの下流にキメラ殺虫性蛋白遺伝子が接続したプラスミDの構造2種類をそれぞれ確認し、①の組合せから得られた発現プラスミDをpACA1、②の組合せから得られた発現プラスミDをpACA3と名付けた(第2図参照)。なお、各キメラ蛋白遺伝子は、発現プラスミDを制限酵素BamHIおよびPstIで切断することにより容易に単離することができる。

III. 大腸菌でのキメラ殺虫性蛋白の生産

構築した各キメラ蛋白発現プラスミDpAAC1, pACA1, pACC1, pCCA1, pCAC1, pCAA1, pACCA1およびpACACA3をCohenらの方法に従い大腸菌JM103株へ導入した。

得られた大腸菌形質転換体JM103/pAAC1, JM103/pACA1, JM103/pACC1, JM103/pCCA1, JM103/pCAC1, JM103/pCAA1, JM103/pACCA1およびJM103/pACACA3が生

産するキメラ殺虫性蛋白の同定、分析を以下の如く行なった。各大腸菌菌株をLプロス液体培地(10gのトリプトン(ディフコ社)、5gのNaCl、5gのイーストエキストラクト(ディフコ社)を1ℓの蒸留水に溶解させた培地)中で一夜培養する。培養液0.25 ℓを分取し遠心操作(10,000rpm 2分間)により集菌し、100 μℓのサンプル緩衝液(62.5mMトリス-塩酸(pH8.8)、2%(W/V)ドデシル硫酸ナトリウム、5%(V/V)2-メルカプトエタノール、10%(V/V)グリセロール、0.01%(W/V)ブロムフェノールブルー)に懸濁後、100℃5分間熱処理した。10,000rpmで5分間遠心し上清を分取した後、その20 μℓをLaemmliらの方法(Nature 227, 680-685)に従ってSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。泳動後、ゲルをクマージブリアントブルーで染色し、脱気乾燥してロ紙に固定した。その結果、キメラ蛋白発現プラスミドpAAC1, pCAA1, pCAC1を含む大腸菌JM103株では分子量125KDの蛋白バンドが検出され、キメラ蛋白発現プラスミドpACA1, pACC1, pCCA1, pACCA1,

pCACA3を含む大腸菌JM103株では分子量130KDの蛋白バンドが検出された。これらの蛋白バンドはいずれも抗125KD, 130KD 殺虫性蛋白抗体と特異的な交叉反応を示した。

ゲル上の各キメラ蛋白バンドをデンストメーターで測定したところ、各キメラ蛋白発現プラスミドを含む大腸菌JM103株はそれぞれ全菌体蛋白あたり25~30%に相当するキメラ殺虫性蛋白を生産した(第3図参照)。従って、これらの大腸菌形質転換体は、バチラス・チューリゲンシス・アイザワイIPL株の125KD 殺虫性蛋白と130KD 殺虫性蛋白とから構成されるキメラ殺虫性蛋白を効率よく生産していることが確認された。

IV. 大腸菌で生産されたキメラ殺虫性蛋白の調製法

大腸菌形質転換体JM103/pAAC1, JM103/pACA1, JM103/pACC1, JM103/pCCA1, JM103/pCAA1, JM103/pCAC1, JM103/pACCA1およびJM103/pCACA3をそれぞれLプロス液体培地中で一夜培養した後、その0.1 ℓを10 ℓのLプロス培地に移し、37℃で20時間培

養した。培養液5 ℓを分取し、6000rpm、5分間遠心して菌を集め、-80℃で凍結させた後、室温で融解させた。この操作を3回繰り返した後、2 ℓのTE緩衝液に懸濁し30秒間ずつ5回の超音波処理を行った。次に、この粗抽出液を7,000rpmで5分間遠心し沈澱を集めた。この沈澱画分を電気泳動用サンプル緩衝液に懸濁して100℃5分間熱処理を行なった後、SDS-PAGEで分析したところ、各菌株から調製した沈澱画分において、含まれる蛋白の約85%がキメラ殺虫性蛋白であった。従って、上記調製法を用いることにより、容易に効率よくキメラ殺虫性蛋白を調製できることが明らかとなった。なお、この調製法は、大量の培養液について有効であることを確認している。

V. 大腸菌で生産されたキメラ殺虫性蛋白の殺虫活性

IVに記載した方法で調製したキメラ殺虫性蛋白AAC, ACC, ACA, と、同様に調製した125KD 殺虫性蛋白の懸濁液をそれぞれ1 ℓずつ人工飼料に浸み込ませた後、4令のハスモンヨトウ10匹に摂食さ

せ、3日後の死虫数を観察した。また、各蛋白の懸濁液それぞれ50 ℓにカンラン葉を浸した後、風乾し、3令のコナガ幼虫10匹に摂食させ、3日後の死虫数を観察した。

1 mg/ℓの蛋白懸濁液をハスモンヨトウに与えたとき、AAC 蛋白では10匹中9匹が、ACA 蛋白では10匹中10匹が、ACC 蛋白では10匹中10匹がそれぞれ死亡し、それに対して125KD 蛋白では10匹中10匹が死亡した。また、2 μg/ℓの蛋白懸濁液をコナガ幼虫に与えたとき、AAC 蛋白では10匹中5匹が、ACA 蛋白では10匹中7匹が、ACC 蛋白では10匹中9匹がそれぞれ死亡し、それに対して125KD 蛋白では10匹中6匹が死亡した。

従って、キメラ殺虫性蛋白ACA およびACC は、両害虫に対して、125KD 蛋白と同等かあるいはそれ以上の殺虫活性を示すことが明らかとなった。また、キメラ殺虫性蛋白AAC も、125KD 蛋白に匹敵する殺虫活性を示すことが確認された。

参考例 1

1. 125KD殺虫性蛋白遺伝子の単離

鱗翅目昆虫コナガおよびハスモンヨトウに対して高い殺虫活性を示すバチラス・チュリンゲンシス・アイザワイIPL№7株の選抜

アイザワイIPL株(ユ・エス・デパートメントオブアグリカルチャーリサーチサービス(U.S.Department of Agriculture Research Service)保管)をPY平板培地(トリプトン(シグマ社)10g、NaCl(半井化学)5g、イーストエキストラクト(シグマ社)5g、および寒天(シグマ社)12gを加えて1ℓとし、作製した寒天培地)上で純化し、得られた純化菌株32個につき、プラスミド解析を行った。各々の菌株を10mℓのPY液体培地(PY平板培地より寒天を除いた培地)で24時間培養後、菌を遠心操作(20,000×g, 30分間)により集菌し、BirnbomとDoly(Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523.)らの方法に従い、プラスミドDNAを調製し、0.8%アガロースゲル電気泳動によりプラスミド解析を行った。その結果、解析した32個の

ちいてDNAオリゴマーを合成した後、DNA捕集バイアルに27%水酸化アンモニウムを1mℓ加え、55℃で4時間加温し、濃縮器にかけ乾固させた。乾固後、100μℓの0.01Mトリエチルアミン酢酸(TEAA)(pH7.2)に溶解し、逆相HPLCカラムc18にかけ、アセトニトリル-0.1MTEAA(pH7.2)の溶媒系で溶出を行った。260nmの吸収ピーク画分を分取し、乾固後100μℓのアセトニトリルで調製した80%酢酸を加え、15分間放置した。15分間経過後、淡オレンジ色を呈したら、乾固し、0.01MTEAA(pH7.2)100μℓを加え、さらに酢酸エチルを100μℓ加え、混合した。酢酸エチル相をすて、ジエチルエーテル100μℓを加え、同様の操作を2回行い、乾固した。0.01MTEAA(pH7.2)で溶解し、再びHPLCによる260nm吸収ピーク画分を分取し、乾固後、10mMトリス-塩酸(pH7.5)+1mMEDTA(TE)溶液に溶解した。つぎに、調製した合成DNAプローブの³²P標識化を行った。5μℓの合成

純化菌株は同一のプラスミドパターンを示さず、少なくとも9つの異なるプラスミドパターンに分類でき、4.0Md, 4.8Md, 5.4Md, 8.5Md, 12Md, 15Md, 17Md, 21Md, 37Md, 40Md, 50Md, 52Mdの12本のプラスミドDNAバンドが観察された菌株をアイザワイIPL№7株と名付けた。

このアイザワイIPL№7株は、ブグベスト国際寄託当局(工業技術院微生物工業技術研究所)へ、Bacillus thuringiensis subsp. aizawai IPL NO.7、寄託番号微工研条寄第1150号として寄託されている。

アイザワイIPL№7株の殺虫性蛋白遺伝子のクローニング

ステップ1: 合成DNAプローブの作製

バチラス・チュリンゲンシス・クリスターキ・HD-1 Dipel株の殺虫性蛋白遺伝子の塩基配列(Whitleyら、J. Biol. Chem. 260, 6264-72 (1985))を参考に合成DNAプローブ(5'-CACAAATCCA GCACCGGG-3')を作製した。アプライド・バイオシステム社のDNA合成機モデル380Aをも

DNAプローブ(約100pmole)に大腸菌ポリスケレオチドカイネース(宝酒造)を15ユニット、100μCiの(γ-³²P)ATP(アマーシャム・ジャパン)および10倍濃度の反応混液(0.5Mトリス-塩酸(pH7.6)、0.1MMgCl₂、0.1M2-メルカプトエタノール)を10μℓ加えたのち蒸留水を加えて、全容を100μℓとし、37℃1時間反応後、クロロホルム:フェノール(1:1)を加え混合後、上澄を分取した。分取した上澄を、TE緩衝液(pH7.5)で平衡化したDE-52カラム(ワットマン社、0.5mℓのベッドサイズ)にアプライし、3mℓのTE緩衝液(pH7.5)で洗浄後、0.7MNaCl-TE緩衝液(pH7.5)で溶出を行い、放射活性画分を分取し、³²P標識合成DNAプローブを作製した。

ステップ2: アイザワイIPL№7株のプラスミドDNAライブラリーの作製

200mℓのPY液体培地で培養したアイザワイIPL№7株の菌体を30mℓのG緩衝液(10%グリセロール、1mMEDTA, 50mMト

リブス-塩酸 (pH 8.0) で洗浄し、8 ml のリゾチーム (5 mg/ml) に懸濁し、30℃で2時間反応させた。つぎに、アルカリ溶液 (0.2N NaOH, 1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)) を16 ml 加え、混合し、室温に10分間放置したのち、中和溶液 (3M酢酸ナトリウム (pH 4.8)) を12 ml 加え、4℃に1.5時間放置した。遠心操作 (14,000 rpm, 20分間) により上澄を分取し、冷エタノールを70 ml 加え、-20℃で1時間放置し、エタノール沈澱により、DNAを回収した。乾固後、5 ml の0.1M酢酸ナトリウムに懸濁し、TE緩衝液 (pH 7.5) で平衡化したフェノールによる処理を2回行ったのち、上澄を分取し、2容の冷エタノールを加え、再度エタノール沈澱した。さらに、乾固後、6 ml のTE緩衝液 (pH 7.5) に懸濁し、常法に従って塩化セシウム平衡密度勾配遠心により、プラスミドDNAを精製した。

つぎに、5 µg のプラスミドDNAを10ユニットの制限酵素 BamHI で切断し、等容の

フェノール:クロロホルム (1:1) を加え混合した後、上澄をとり、エタノール沈澱によりDNAを回収し、乾固後、20 µl のTE緩衝液 (pH 7.5) に懸濁した。また、2 µg のpUC8ベクタープラスミド (ファルマシア社) を5ユニットの制限酵素 BamHI で消化後、同様の操作でDNAを回収し、20 µl のTE緩衝液 (pH 7.5) に懸濁後、5 µl の大腸菌アルカリホスファターゼ (宝酒造、2.0ユニット)、50 µl の0.1Mトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0)、15 µl の蒸留水を加えた後、60℃で1時間インキュベートし、アルカリフォスターゼ処理を行った。反応後、フェノール-クロロホルム処理を2回行ったのち、上澄を分取し、エタノール沈澱によりDNAを回収し、20 µl のTE緩衝液 (pH 7.5) に懸濁した。つぎに、15 µl の BamHI 切断プラスミドDNA溶液と15 µl の BamHI 切断pUC8ベクターDNA溶液を混合後、1 µl のT4DNAリガーゼ (宝酒造、0.1ユニット)、7.5 µl の0.1Mジチオスレイトール (半井化学)、7.5 µl

の10mMアデノシン3リン酸 (半井化学)、25 µl の3倍濃度反応混液 (200 mMトリス-塩酸 (pH 7.6) 20 mM MgCl₂) および5 µl の蒸留水を加え、全容75 µl とし、14℃で6時間インキュベートした。得られたリガーゼ反応液10 µl を、スコットらの方法 (細胞工学、2、616-626、1983) で調製した100 µl の大腸菌DH1株 (ATCC 33849) のコンピテントセルに加え、0℃で15分間インキュベートし、42℃で40秒間熱処理したのち、0.9 ml のLブロス液体培地 (トリプトン10g、イーストエキストラクト5g、NaCl 5g、グルコース (半井化学) 1gを加え、蒸留水で全容1 l とする) を加え、37℃で1時間インキュベートし、最終濃度50 µg/ml のアンピシリンを含むLブロス平板培地 (Lブロス液体培地に1.2%となるよう寒天を加えたもの) にプレートした。

ステップ3: コロニーハイブリダイゼーションによる殺虫性蛋白遺伝子クローンの単離

プレートに広げたコロニーを2枚のニトロセルロースフィルターにレプリカし、さらにアンピシリン (50 µg/ml) 及びクロラムフェニコール (600 µg/ml) を含む平板プレートに移し、一夜インキュベートした。1枚のフィルター当たり、2.5 ml の0.5N NaOHを加え、5分間処理し、風乾後、等容の1Mトリス-塩酸 (pH 7.5) を加え、5分間放置した。風乾後、さらに2.5 ml の1Mトリス-塩酸 (pH 7.5)-1.5M NaCl で5分間処理し、風乾後、80℃で3時間、真空下で処理した。フィルター4枚当たり、10 ml の0.1% SDS-4xSSC (SSCは0.15M NaCl-0.015Mクエン酸ナトリウム (pH 7.5) を示す) を加え、60℃15分処理後、フィルター上のコロニーをふきとり、6 ml のプレハイブリ溶液 (4xSSC、10xデンハート、100 µg/ml サーマンテステイス1本鎖DNA (シグマ社); 但し、10xデンハートは、0.2%フィコール、0.2%、ポリビニルピロリドン、0.2%BSAを含む溶液である) に浸し、

60℃で3時間処理した。つぎに上記溶液に、ステップ1で作製した³²P標識化合成DNAプローブを加えたハイブリ溶液中にフィルターを入れ、56℃一夜インキュベートした。ハイブリダイゼーション後、56℃の4×SSC-0.1% SDS溶液で15分間4回洗浄し、フィルターを乾燥させ、X線フィルムにはさみ、オートラジオグラフィを行った。ポジティブシグナルを与えるコロニーをマスタープレートより拾い、再度、同様のコロニーハイブリダイゼーションを行い、ポジティブクローン大腸菌DH1/pAB6を単離した。

バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイI PL株の殺虫性蛋白遺伝子の解析

単離したポジティブクローン大腸菌DH1/pAB6から Birnboim と Doly らの方法に従って、プラスミドpAB6を単離した。プラスミドpAB6を制限酵素、BamHI、HinDI、PstI、BglII、PvuI、EcoRI、AhaIII、KpnI、ClaIを用いて切断し、0.

7%アガロース電気泳動で分析することにより、インサートDNA 22.4kbの制限酵素地図を作製した(第6図上部)。さらに、上述の合成DNAプローブを用いたサザン・ハイブリダイゼーション法(J. Mol. Biol. 98, 503-517(1975))により、インサートDNA中の殺虫性蛋白遺伝子領域を特定し、その領域の詳細な制限酵素地図を作製した(第6図下部)。続いて、各種制限酵素で切断したDNA断片をベクターpUC8にサブクローニングした後、BirnboimとDolyらの方法によりDNA断片を含むプラスミドDNAを調製した。得られたDNAを18μlのTE(pH7.5)に懸濁後、2μlの2N NaOHを加え、室温で5分間放置し、8μlの7.5 M酢酸アンモニウムを加え、100μlの冷エタノールを加え、エタノール沈澱を行った。

12,000 rpmで5分間遠心し、沈澱を回収後、乾燥し、0.5 pmol/5 mlとなるよう蒸留水に溶解させた。5μlの調製したプラスミドDNA(5 pmol)に、1.5μlの10倍容濃度クレノー緩

衝液(宝酒造)、1μlのプライマーDNA(PLバイオケミカル社)、4.5μlの蒸留水を加え、全容を12μlとし、60℃で15分間加温後、室温に20分間放置した。この反応液に2μlの(α-³²P) ATP(400Ci/mmol, アマーシャム・ジャパン)と1μlのクレノー断片酵素(宝酒造、2ユニット)を加え、混合した。この混合液の3.2μlずつを4種類の2μlのdNTP + ddNTP混合液(宝酒造)に加え、42℃で20分間放置した。各々に1μlのチェース溶液(宝酒造)を加え、さらに、42℃で20分間放置した。最後に、6μlの95%ホルムアミド色素(0.1%ブロムフェノールブルーと0.1%のキシレンシアノールを含む)を加えた。常法に従い、6%アクリルアミド・尿素ゲルを作製し、上記反応液2μlをアプライし、1700Vで6時間、電気泳動を行った。ゲルを乾燥後、X線フィルムにはさみ、感光後、塩基配列を読み取った。解明した塩基配列を第5図に示す。バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイI PL株

の殺虫性蛋白遺伝子は、開始コドンATGから始まり、ストップコドンTAAで終わる3465塩基のコーディング領域をもち、1155のアミノ酸をコードしていた。

2. バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイI PL株の殺虫性蛋白遺伝子の制限酵素内発現を目的とした発現プラスミドpAH8およびpAH7の構築

ステップ1: AhaIII DNA断片の調製

殺虫性蛋白遺伝子を含む約10μgの組換え体プラスミドpAB6に、約30ユニットの制限酵素AhaIIIを加え、30μlのAhaIII反応液(10 mMトリス-塩酸(pH7.5), 60 mMNaCl, 7 mM MgCl₂, 10 mM EDTA, 1 mMジチオスレイトール)中で37℃で1時間反応後、反応液を0.1 μg/mlの臭化エチジウムを含む0.8%の低融点アガロースゲル(ベセスダ・リサーチ・ラボラトリー社製)に供し、アガロース電気泳動を行った。泳動後、紫外線ランプ下で、3.5 KbのAhaIII DNA断片に

相当するゲル部分を切り出し、試験管にとり、65℃で5分間加熱した。融解したゲルに2倍量のTE緩衝液(10mM トリス-塩酸(pH 8.0), 0.5mMEDTA)を加え、TE緩衝液で飽和したフェノールを加えて、フェノール抽出を行った。10,000 rpmで5分間遠心し、上層を分取した後、1/40量の4M NaClおよび2倍量のエタノールを加えて、-80℃に10分間放置することによりDNAをエタノール沈澱した後、10,000 rpmで10分間遠心し、DNAを回収し、100μlの蒸留水に懸濁した。

ステップ2: ベクターの調製

1μgの発現ベクターpUC18(ファルマシア社)に、1ユニットの制限酵素HincII(宝酒造)を加え、20μlのHincII反応液(10mMトリス-塩酸(pH 7.4), 100mM NaCl, 7mM MgCl₂, 10mMジチオスレイトール)中で37℃1時間反応した。反応後、反応液に等量のフェノール・クロロホルム(1:1)混液を加え、混合し、10,000 rpmで5分間遠

心し、10mM MgCl₂, 1mM 2-メルカプトエタノール, 100μg/ml牛血清アルブミン)中で37℃1時間反応し、アガロース電気泳動で分析した。アガロース電気泳動の結果より、発現ベクターのlacプロモーターと順方向に殺虫性蛋白遺伝子が接続した発現プラスミドをpAH8とし、逆方向に接続した発現プラスミドをpAH7とした(第4図参照)。

3. パチラス・チュリンゲンシス・アイザワイI PL株の殺虫性蛋白遺伝子の大腸菌内発現を目的とした発現プラスミドpTB1の構築

ステップ1: 殺虫性蛋白遺伝子を含むPstI-BamHI断片の調製

殺虫性蛋白遺伝子を含む約5μgの発現プラスミドpAH8に、約20ユニットの制限酵素PstIおよび約20ユニットの制限酵素BamHIを加え、50μlのPstI反応液(10mMトリス-塩酸(pH 7.5), 50mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM 2-メルカプトエタノール, 100μg/ml牛血清アルブミン)中

心後、上澄を分取した。つぎに、2倍量の冷エタノールを加えて、-80℃に15分間放置した後、10,000 rpmで10分間遠心し、DNAを回収し、10μlの蒸留水に懸濁した。

ステップ3: 発現プラスミドpAH7および

pAH8の構築

ステップ1およびステップ2で調製したAhaIII DNA断片および発現ベクターpUC18をそれぞれ1μgずつ混合し、7.2ユニットのT4 DNAリガーゼ(宝酒造)を加え、45μlのリガーゼ反応液(66mMトリス-塩酸(pH 7.6), 66mM MgCl₂, 10mMジチオスレイトール, 1.0mM ATP)中で16℃、2時間反応した。その後、Cohenらの方法に従い、反応液を大腸菌JM103(ファルマシア社)に形質転換した。出現したアンピシリン耐性コロニーを培養し、Birnbomらの方法に従いプラスミドDNAを調製した。約1μgのプラスミドDNAに、3ユニットの制限酵素HindIIIを加え、HindIII反応液(10mMトリス-塩酸(pH 7.5), 60mM NaCl,

37℃1時間反応後、30μlのTE緩衝液で飽和したフェノールを加えて、フェノール抽出を行った。10,000 rpmで5分間遠心し、上層を分取後、1/40量の4M NaClおよび2倍量のエタノールを加えて、-80℃に10分間放置した。10,000 rpmで10分間遠心後、DNAを回収し、乾固させたのち、20μlの蒸留水に懸濁した。

ステップ2: ベクターの調製

約5μgの発現ベクターpKK223-3(ファルマシア社製)に、0.1ユニットの制限酵素BamHI(宝酒造)を加え、BamHI反応液(10mMトリス-塩酸(pH 8.0), 7mM MgCl₂, 100mM NaCl, 2mM 2-メルカプトエタノール, 0.01%ウシ血清シルブミン)中で、37℃15分間反応した。反応液を0.1μg/mlの臭化エチジウムを含む0.8%の低融点アガロースゲルに供し、電気泳動を行った。泳動後、紫外線ランプ下で、pKK223-3が保持する2個のBamHI認識部位のうち、1つのみ切断されたと推定されるDNA分子(4.6K

b) を切り出し、試験管にとり、65℃で5分間加熱した。ゲルを融解し、フェノール抽出後、エタノール沈澱を行い、DNAを回収し、20μℓの蒸留水に懸濁した。調製したDNA溶液に、最終濃度3mMの4種デオキシリボスクレオチドおよび5ユニットの大腸菌DNAポリメラーゼI、ラージフラグメントを加え、60μℓのHindⅢ反応液(10mMトリス-塩酸(pH7.5), 60mMNaCl, 10mMMgCl₂, 1mM2-メルカプトエタノール, 100μg/ml牛血清アルブミン)中で、25℃、2時間反応後、フェノール抽出、エタノール沈澱を行い、DNAを回収し、20μℓの蒸留水に懸濁した。約1μgの回収したDNAに、3ユニットT4DNAリガーゼ(宝酒造)を加え、45μℓのリガーゼ反応液(66mMトリス-塩酸(pH7.6), 6.6mMMgCl₂, 10mMジチオスレイトール, 1.0mMATP)中で16℃、2時間反応した。その後、コーエンらの方法に従い、反応液を大腸菌JM103株に形質転換した。出現したアンピ

シリン耐性コロニーを培養し、Birnboimらの方法に従い、プラスミドDNAを調製した。約1μgのプラスミドDNAに、3ユニットの制限酵素BamHIを加え、BamHI反応液中で37℃、1時間反応し、アガロース電気泳動で分析した。解析したプラスミドのうち、pKK223-3プラスミドのマルチ・クローニング部位のBamHI部位が保存されており、他のBamHI部位が消失しているプラスミドを選択し、pKK223-4とした。つぎに、約5μgのpKK223-4DNAに、10ユニットの制限酵素PstIおよび10ユニットの制限酵素BamHIを加え、50μℓのPstI反応液(10mMトリス-塩酸(pH7.5), 50mMNaCl, 10mMMgCl₂, 1mM2-メルカプトエタノール, 100μg/ml牛血清アルブミン)中で、37℃、1時間反応後、フェノール抽出、エタノール沈澱を行った後、DNAを回収し、20μℓの蒸留水に懸濁した。

ステップ3: 発現プラスミドpTB1の構築

ステップ1およびステップ2で調製したPstI-BamHI切断DNA断片およびベクターpKK223-4をそれぞれ1μgずつ混合し、7.2ユニットのT4DNAリガーゼ(宝酒造)を加え、45μℓのリガーゼ反応液(66mMトリス-塩酸(pH7.6), 6.6mMMgCl₂, 10mMジチオスレイトール, 1.0mMATP)中で16℃、2時間反応した。コーエンらの方法に従い、反応液を大腸菌JM103株に形質転換した。出現したアンピシリン耐性コロニーを培養し、プラスミドDNAを調製した。約1μgのプラスミドDNAに、3ユニットの制限酵素BamHIを加え、30μℓのBamHI反応液中で37℃、1時間反応し、アガロース電気泳動で分析した。アガロース電気泳動の結果より、発現ベクターのtacプロモーターの下流に、殺虫性蛋白遺伝子が接続したプラスミドを選択し、これを発現プラスミドpTB1とした(第4図参照)。

参考例2

1. 130KD殺虫性蛋白遺伝子の単離 バチラス・チューリンゲンシス・アイザワイ7A 021株の選抜

バチラス・チューリンゲンシス・アイザワイIP LNo. 7(ブダベスト国際寄託 寄託番号微工研条寄第1150号)をアクリジノオレンジ(0.04μg/ml)を含むPY液体培地(トリプトン(シグマ社)10g、NaCl(半井化学)5g、イーストエキストラクト(シグマ社)5gを加えて1ℓとし、pH7.0として作製した培地)中で30℃で一晩培養し、10⁸倍希釈の0.1mlをスターチアガー平板培地(シグマ社スターチアガー25gを1ℓ蒸留水にとかし、オートクレーブしたもの)に接種し、30℃で3日間培養した後、コロニーを選抜した。位相差顕微鏡により、胞子と結晶を確認後、アルカリラビッド法によりプラスミドDNAを調製し、アガロース電気泳動で分析した。

その結果、52Mdプラスミドの脱落した7A021株を得た。52Mdプラスミドにはプラ

スミド由来の殺虫性蛋白遺伝子が含まれているので、a7A021株にはこの殺虫性蛋白遺伝子は存在しない。a7A021株をPY液体培地で30℃、7日間培養し、集菌し、凍結-融解を3回繰り返した後、蒸留水に懸濁し、超音波破碎処理を行うことにより、結晶懸濁液を調製した。得られた調製液 2.2×10^7 孢子/ml及び 2.2×10^8 孢子/mlをそれぞれカンランの葉に浸漬した後、コナガ3令幼虫に摂食させた。

その結果、 2.2×10^7 孢子/mlの濃度では20匹中20匹のコナガが死亡し、 2.2×10^8 孢子/mlの濃度では20匹中12匹の死亡が確認された。ハスモンヨトウについても4令幼虫を用い、同様の試験を行った。結晶懸濁液(1mlあたり 2.6×10^8 孢子を含む)を1mlハスモンヨトウに与えたとき、20匹中7匹が死亡した。従って、a7A021株は、両害虫に対して高い殺虫活性を示すことが明らかとなった。

アイザワイ a7A021 株の殺虫性蛋白遺伝子

次に、10μgのa7A021株の全DNAに10ユニットの制限酵素AhaⅢ(ファルマシア社)を加え、30μlのAhaⅢ反応液(10mMトリス-塩酸(pH7.5)、60mMNaCl、7mMMgCl₂、10mMEDTA、1mMジチオスレイトール)中で37℃1時間反応後、反応液を0.1μg/mlの臭化エチジウムを含む0.8%の低融点アガロースゲル(ベセスダ・リサーチ・ラボラトリ社)に供し、アガロース電気泳動を行った。泳動後、紫外線ランプ下で、3.5KbのAhaⅢDNA断片に相当する部分を切出し、試験官にとり、65℃で5分間加熱した。融解したゲルに2倍容TE緩衝液(10mMトリス-塩酸(pH8.0)、0.5mMEDTA)を加え、TE(10mMトリス-塩酸、1mMEDTA(pH8.0))緩衝液で飽和したフェノールを加えて、フェノール抽出を行った。

10,000rpmで5分間遠心し、上層を分取した後、1/40の4MNaClおよび2倍容のエタノールを加えて、-80℃に10分間放置

のクローニング

ステップ1:アイザワイ a7A021 株の染色体DNAライブラリーの作製

250mlのPY液体培地にアイザワイ a7A021株を植菌し、終夜培養した。菌を6,000rpmで10分間遠心し、集菌後、100mlの100mMNaCl、10mMトリス-塩酸(pH7.9)-10mMEDTAで洗浄した。再度、集菌して10mlの150mMNaCl-100mMEDTA(pH7.9)に懸濁し、最終濃度0.25mg/mlのリゾチームを加えた。37℃で1時間インキュベートし、13mlの100mMトリス-塩酸(pH7.9)-100mMNaCl-2%SDSを加えて、ゆっくり混合した。次に、上記SDS溶液で飽和したフェノール-クロロホルム(1:1)混液で4回抽出を繰り返した後、上層を分取し、2容の冷エタノールを加えて、生じた白い沈澱をガラス棒で回収した。80%エタノールで3回洗浄後、乾固し、200μlの蒸留水に懸濁した。

することによりDNAをエタノール沈澱した後、

10,000rpmで10分間遠心し、DNAを回収し、10μlの蒸留水に懸濁した。また、5μgのpUC18ベクタープラスミド(ファルマシア社)を5ユニットの制限酵素HincⅡで消化後、等容のTE飽和フェノールを加え、混合後、上層を分取した。次に、同様の操作でエタノール沈澱、DNAを回収し、20μlの蒸留水に懸濁した。このDNA溶液に5μlの大腸菌アルカリホスファターゼ(宝酒造、2ユニット)、50μlの0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)、15μlの蒸留水を加えた後、60℃で1時間インキュベートし、アルカリホスファターゼ処理を行った。反応後、フェノール-クロロホルム処理を2回行った後、上澄を分取し、エタノール沈澱によりDNAを回収し、20μlの蒸留水に懸濁した。

次に、10μlのAhaⅢ切断全DNA溶液と10μlのHincⅡ切断pUC18ベクターDNA溶液を混合後、1μlのT4DNAリガーゼ

(宝酒造、0.1ユニット)、7.5 μ l の0.1 M ジチオスレイトール (半井化学)、7.5 μ l の10 mM アデノシン3リン酸 (半井化学)、25 μ l の3倍濃度反応混液 (200 mM トリス-塩酸 (pH 7.6)、20 mM MgCl₂) および5 μ l の蒸留水を加え、全容75 μ l とし、14℃で6時間インキュベートした。得られたリガーゼ反応液10 μ l をスコットらの方法 (細胞工学、2、616-626 (1983)) で調製した100 μ l の大腸菌DH1株 (ATCC 33849) のコンピテントセルに加え、0℃で15分間インキュベートし、42℃で40秒間熱処理した後、0.9 ml のLプロス液体培地 (10 g のトリプトン、5 g のNaCl、5 g のイーストエキストラクト、グルコース1 g を加え蒸留水で1 l とした培地) を加え、37℃で1時間インキュベートし、最終濃度50 μ g/ml のアンピシリンを含むLプロス平板培地 (Lプロス液体培地に1.2%となるように寒天を加えた培地) にプレートした。

A (シグマ社) ; 但し、10 x デンハートは、0.2% フィコール、0.2% ポリビニルピロリドン、0.2% BSA を含む溶液を意味する) に浸し、60℃で3時間処理した。次に、上記溶液に、ステップ1で作製した³²P 標識化合成DNA プローブを加えたハイブリ溶液中にフィルターを入れ、56℃で1夜インキュベートした。ハイブリダイゼーション後、56℃の4 x SSC - 0.1% SDS 溶液で15分間4回洗浄し、フィルターを乾燥させ、X線フィルムにはさみ、オートラジオグラフィを行った。ポジティブシグナルを与えるコロニーをマスタープレートより拾い、再度、同様のコロニーハイブリダイゼーションを行い、ポジティブクローン大腸菌DH1/pCA5およびDH1/pCA1を単離した。

アイザワイ a 7A021 株の殺虫性蛋白遺伝子の解析

単離したポジティブクローン大腸菌DH1/pCA5およびDH1/pCA1からBirnbomとDolyらの方法に従って、それぞれプラスミドpCA

ステップ2: コロニーハイブリダイゼーションによる殺虫性蛋白遺伝子のクローンの単離

プレートに広げたコロニーを2枚のニトロセルロースフィルターにレプリカし、更に、アンピシリン (50 μ g/ml) 及びクロラムフェニコール (600 μ g/ml) を含む平板プレートに移し、一夜インキュベートした。一枚のフィルター当り、2.5 ml の0.5 N NaOHを加え、5分間処理し、風乾後、等容の1 M トリス-塩酸 (pH 7.5) を加え、5分間放置した。風乾後、さらに2.5 ml の1 M トリス-塩酸 (pH 7.5) - 1.5 M NaCl で5分間処理し、風乾後、80℃で3時間、真空下で処理した。フィルター4枚あたり、10 mM の0.1% SDS - 4 x SSC (SSCは0.15 M NaCl - 0.015 M クエン酸ナトリウム (pH 7.5) を示す) を加え、60℃で15分間処理後、フィルター上のコロニーを拭き取り、6 ml のブレイブリ溶液 (4 x SSC、10 x デンハート、100 μ g/ml サーマンテステイス1本鎖DN

5およびpCA1を単離した。プラスミドpCA5およびpCA1を制限酵素、ClaI、EcoRI、SacI、HindIII、KpnIを用いて切断し、0.7% アガロースゲル電気泳動で分析することにより、インサートDNA (約3.5 Kb) の制限酵素地図を作製した (第7図参照) その結果、pCA1はpCA5と逆向きにインサートDNAを組み込んだクローンであることが判明した。

続いて、塩基配列決定を行う為、プラスミドpCA5を各種制限酵素で切断し、ベクターpUC8およびpUC9にサブクローニングした後、BirnbomとDolyらの方法に従ってDNA断片を含むプラスミドDNAを調製した。

得られたDNAを18 μ l のTE (pH 7.5) に懸濁後、2 μ l の2 N NaOHを加え、室温で5分間放置し、8 μ l の7.5 M 酢酸アンモニウムを加え、100 μ l の冷エタノールを加え、エタノール沈澱を行った。

12,000 rpmで5分間遠心し、沈澱を回収

後、乾固し、 $0.5 \mu\text{mol}/5 \text{ mL}$ となるように蒸留水に溶解させた。 $5 \mu\text{L}$ の調製したプラスミドDNA ($5 \mu\text{mol}$)に $1.5 \mu\text{L}$ の10倍濃縮クレノー緩衝液(宝酒造) $1 \mu\text{L}$ のプライマーDNA (PL-バイオケミカル社)、 $4.5 \mu\text{L}$ の蒸留水を加え、全容を $12 \mu\text{L}$ とし、 60°C で15分間加温後、室温で20分間放置した。

この反応液に $2 \mu\text{L}$ の($\alpha\text{-}^{32}\text{P}$) ATP ($400 \text{ Ci}/\text{mmol}$ 、アマシャム・ジャパン)と $1 \mu\text{L}$ のクレノー断片酵素(宝酒造、2ユニット)を加え、混合した。この混合液の $3.2 \mu\text{L}$ ずつを4種類の $2 \mu\text{L}$ のdNTP + ddNTP混合液(宝酒造)に加え、 42°C で20分間放置した。各々に $1 \mu\text{L}$ のチェース溶液(宝酒造)を加え、さらに 42°C で20分間放置した。最後に、 $6 \mu\text{L}$ の95%ホルムアミド色素(0.1%ブロムフェノールブルーと0.1%キシレンシアノールを含む)を加えた。常法に従い、6%アクリルアミド・尿素ゲルを作製し、上記反応液 $2 \mu\text{L}$ をアプライし、 1700 V で6時間、電

気泳動を行った。ゲルを乾燥後、X線フィルムにはさみ、感光後、塩基配列を読み取った。解明した塩基配列を第8図に示す。

バチラス・チュウリンゲンシス・アイザワイ a7 A021株の殺虫性蛋白遺伝子は、開始コドンATGから始まり、ストップコドンTAAで終わる3535塩基のコーディング領域をもち、1176個のアミノ酸をコードしていた。

2. バチラス・チュウリンゲンシス・アイザワイ a7 A021株の殺虫性蛋白遺伝子の太陽菌内発現を目的とした発現プラスミドpKKC6の構築 ステップ1: ベクターの調製

約 $5 \mu\text{g}$ の発現ベクターpKK223-3 (ファルマシア社)に、0.1ユニットの制限酵素BamHI (宝酒造)を加え、BamHI反応液(10 mM トリス-塩酸($\text{pH} 8.0$)、 7 mM MgCl_2 、 100 mM NaCl 、 2 mM 2-メルカプトエタノール、 0.01% ウシ血清アルブミン)中で 37°C 、15分間反応した。反応液を $0.1 \text{ mg}/\text{mL}$ の臭化エチジウムを含む0.

8%の低融点アガロースゲルに供し電気泳動を行った後、紫外線ランプ下で、pKK223-3が保持する2個のBamHI認識部位のうち一つのみ切断されたと推定されるDNA分子(4.6 Kb)を切出し、試験管にとり、 65°C で5分間加熱した。ゲルを融解し、フェノール抽出後、エタノール沈澱を行い、DNAを回収し、 $20 \mu\text{L}$ の蒸留水に懸濁した。約 $1 \mu\text{g}$ の回収したDNAに3ユニットT4 DNAリガーゼ(宝酒造)を加え、 $45 \mu\text{L}$ のリガーゼ反応液(66 mM トリス-塩酸($\text{pH} 7.6$)、 6.6 mM MgCl_2 、 10 mM ジチオスレイトール、 1 mM ATP)中で 16°C 、2時間反応した。その後、コーエンらの方法に従い、反応液を太陽菌JM103株に形質転換した。出現したアンピシリン耐性コロニーを培養し、Birnboimらの方法に従い、プラスミドDNAを調製した。約 $1 \mu\text{g}$ のプラスミドDNAに3ユニットの制限酵素BamHIを加え、BamHI反応液中で 37°C 、1時間反応し、アガロース電気泳動で分析した。解析し

たプラスミドのうち、pKK223-3プラスミドのマルチクロニング部位のBamHI部位が保存されており、他のBamHI部位が消失しているプラスミドを選択し、pKK223-4とした。つぎに、約 $5 \mu\text{g}$ のpKK223-4 DNAに、10ユニットの制限酵素PstIと10ユニットの制限酵素BamHIを加え、 $50 \mu\text{L}$ のPstI反応(10 mM トリス-塩酸($\text{pH} 7.5$)、 50 mM NaCl 、 10 mM MgCl_2 、 1 mM 2-メルカプトエタノール、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 牛血清アルブミン)中で、 37°C 、1時間反応後、フェノール抽出、エタノール沈澱を行った後、DNAを回収し、 $20 \mu\text{L}$ の蒸留水の懸濁した。

ステップ2: 殺虫性蛋白遺伝子を含むPstI-BamHI断片の調製

殺虫性蛋白遺伝子を含む約 $5 \mu\text{g}$ の発現プラスミドpCA5に、約20ユニットの制限酵素PstIおよび約20ユニットの制限酵素BamHIを加え、 $50 \mu\text{L}$ のPstI反応液(10 mM トリ

スー塩酸 (pH 7.5)、50 mM NaCl、10 mM MgCl₂、1 mM 2-メルカプトエタノール、100 μg/ml 牛血清アルブミン) 中で、37℃ 1時間反応後、30 μl のTE緩衝液で飽和したフェノールを加えて、フェノール抽出を行った。10,000 rpmで5分間遠心し、上層を分取後、1/40量の4 M NaClおよび2倍量のエタノールを加えて、-80℃に10分間放置した。10,000 rpmで10分間遠心後、DNAを回収し、乾固させたのち、20 μlの蒸留水に懸濁した。

ステップ3: 発現プラスミドpKCK6の構築

ステップ1およびステップ2で調製したPstI-BamHI切断ベクターpKK223-4およびDNA断片をそれぞれ1 μgずつ混合し、7.2ユニットのT4リガーゼ(宝酒造)を加え、45 μlのリガーゼ反応液中で16℃ 2時間反応した。コーエンらの方法に従い、反応液を大腸菌JM103株に形質転換した。出現したアンピシリン耐性コロニーを培養し、プラスミドDNA

を調製した。約1 μgのプラスミドDNAに3ユニットの制限酵素BamHIを加え、30 μlのBamHI反応液中で37℃で1時間反応し、アガロース電気泳動で分析した。アガロース電気泳動の結果より、発現ベクターのtacプロモーターの下流に殺虫性蛋白遺伝子が接続したプラスミドを選択し、これを発現プラスミドpKCK6とした(第9図参照)。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、キメラ殺虫性蛋白発現プラスミドpAAC1, pACA1, pACC1, pCCA1, pCAA1 およびpCAC1の構築方法を示す図である。図中、白色、斜線、横線、ドットのボックスは、それぞれ、125KD 殺虫性蛋白遺伝子、130KD 殺虫性蛋白遺伝子、tacプロモーターおよびリボソームRNAターミネーターを示している。K, H, P はそれぞれ、制限酵素Kpn I, Hind III, PstIを示す。

第2図は、キメラ殺虫性蛋白発現プラスミドpACCA1, pCACA3の構築方法を示す図である。図中、

白色、斜線、横線、ドットのボックスはそれぞれ、125KD 殺虫性蛋白遺伝子、130KD 殺虫性蛋白遺伝子、tacプロモーター、リボソームRNAターミネーターを示している。B, Ec, EV は、それぞれ、制限酵素Bam HI, Eco RI, Eco RVを示す。

第3図は、発現したキメラ殺虫性蛋白の定量をデンストメーターで行った結果である。(1)～(10)はそれぞれ、大腸菌形質転換体JM103/pTB1, JM103/pKCK6, JM103/pAAC1, JM103/pACA1, JM103/pACC1, JM103/pCCA1, JM103/pCAA1, JM103/pCAC1, JM103/pACCA1およびJM103/pCACA3の菌体粗抽出液中の殺虫性蛋白を測定したものである。矢印のピークが、125KD 殺虫性蛋白[(1)], 130KD 殺虫性蛋白[(2)]、キメラ殺虫性蛋白[(3)～(10)]のバンドにそれぞれ相当する。

第4図は、発現プラスミドpAH7, pAH8、およびpTB1の構築方法を示している。黒色、縦線、横線、白色およびドットを含むそれぞれのボックスは、殺虫性蛋白遺伝子、lacプロモーター、リボソームRNAターミネーター、tac

プロモーターおよびlacZ遺伝子を示している。ATGおよびTAAは殺虫性蛋白遺伝子のそれぞれ開始コドン、終止コドンである。Ah, Kp, pv, Bm, Hc, Psは、制限酵素Aha II, Kpn I, Pvu II, Bam HI, Hinc II、およびPstIを示す。

第5図は、125KD 殺虫性蛋白遺伝子の構造遺伝子部分の3465塩基からなる全塩基配列を示す。上段は塩基配列を下段はそれから推定されるアミノ酸配列を示す。塩基配列中、塩基番号1番目から3465番目までの領域が殺虫性蛋白遺伝子の構造遺伝子をコードする領域である。

第6図は、プラスミドpAB6のインサートDNA(22.4 kb)の制限酵素地図を示す。アイザワイIPL株殺虫性蛋白遺伝子領域を太棒で示す。図の下部は、殺虫性蛋白遺伝子領域の詳細な制限酵素部位を示している。

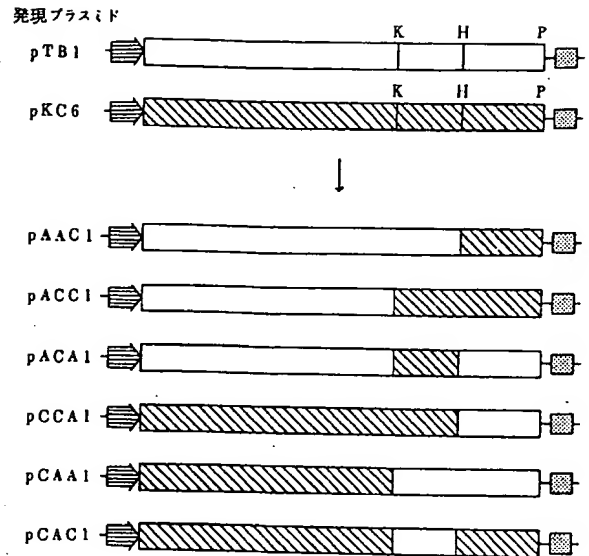
第7図は、プラスミドpCA1およびpCA5のインサートDNA(3.5 kb)の制限酵素地図を示す図である。pCA1とpCA5のイン

サートは、ベクターに対して逆向きに接続している。 図中、P_s、C、E、P_v、S、H、K、Bは、それぞれ制限酵素P_{st}I、C_{la}I、E_{co}RI、P_{vu}II、S_{al}I、H_{ind}III、K_pnI、B_{am}HIを表す。

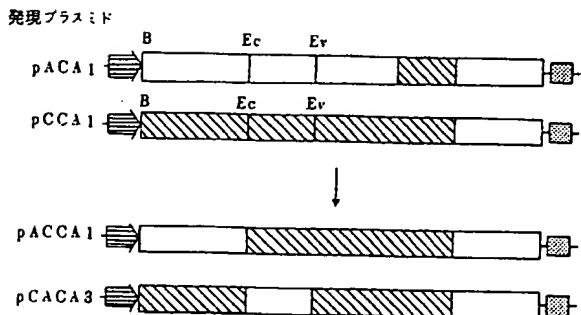
第8図は、130KD殺虫生蛋白遺伝子の構造遺伝子部分の3535塩基からなる全塩基配列を示す。上段は塩基配列を下段はそれから推定されるアミノ酸配列を示す。

第9図は、発現プラスミドpKC6の構築方法を示す図である。 図中、黒色、白色のボックスは、それぞれ、殺虫生蛋白遺伝子、tacプロモーターを示している。 K_p、P_v、B_m、P_sは制限酵素K_pnI、P_{vu}II、B_{am}HI、およびP_{st}Iを示す。

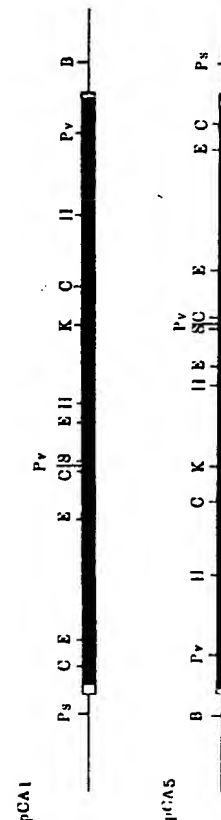
第1図



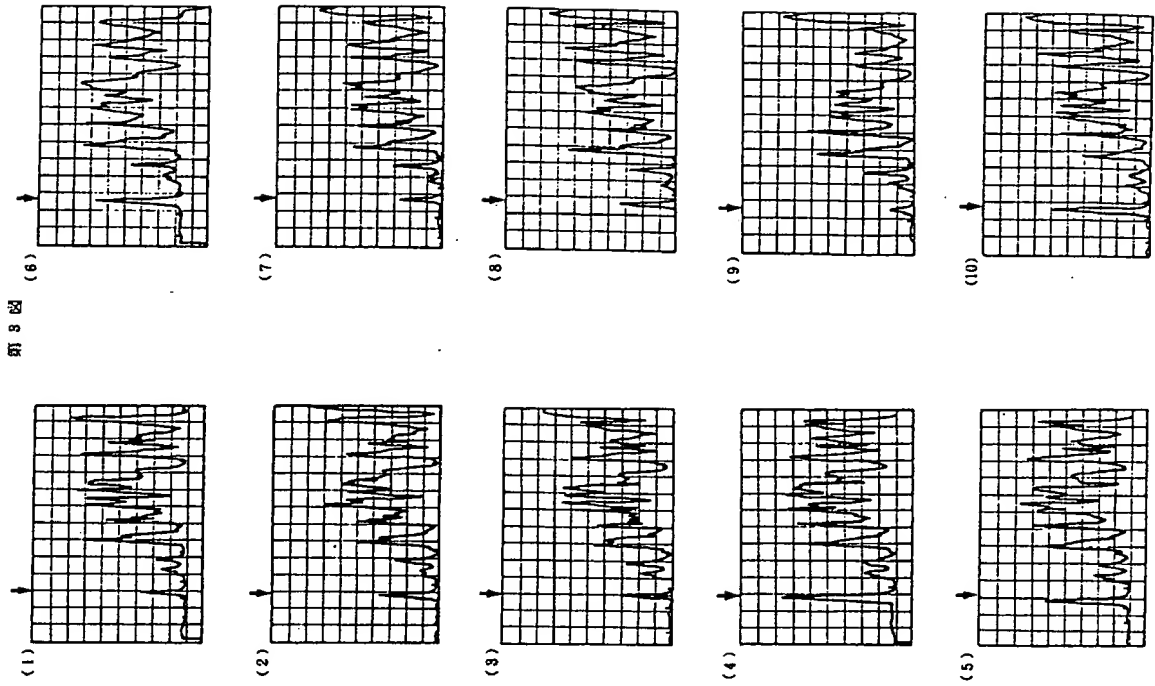
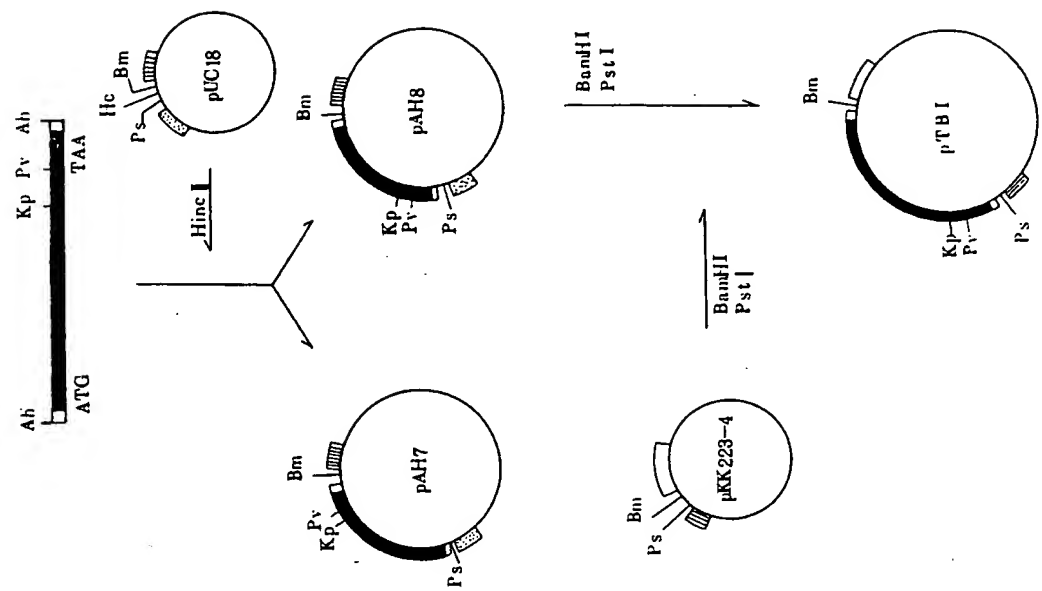
第2図



第7図



第 4 図



第 3 図

第5図 (その1)

TGTTAACACCCCTGGTCAAAATTTGATATTAGTAA

AATTAGTTGCACCTTTGTGCAATTTTTCATAGATGAGTCATATGTTTTAAATTTAGTAGTAATGAAAAACAGTATTATATCATATGAATGGTATCTTAATAAAGAGATGGAGGTAACCTT

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120

ATGGTAACCAATCCGAACATCAATGAATGCATTCTTATAATTTTAAAGTAACCTGAAGTAGAAGTATTAGTGGAGAAAGAAATAGAACTGGTTACACCCCAATCGATATTTCCCTTG

MetAspAsnAsnProAsnIleAsnGluCysIleProTyrAsnCysLeuSerAsnProGluValGluGlyGlyGluThrProIleAspIleSerLeu

130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240

TCGCTAACCAATTTCTTTGAGTGAATTTGTTCCCGTGCTGGATTTGTGTTAGGACTAGTTGATATAATATGGGAATTTTGGTCCCTCTCAATGGGACGCAATTTCTGTACAAAT

SerLeuThrGlnPheLeuLeuSerGluPheValProGlyAlaGlyPheValLeuGlyLeuValIleIleTrpGlyIlePheGlyProSerGlnTrpAspAlaPheLeuValGlnIle

250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360

GAACAGTTAATTAACCAAGAAATAGAAATTCGCTAGGAACCAAGCCATTTCTAGATTAGAAGGACTAAGCAATCTTTATCAAATTTACGCAGAAATCTTTAGAGAATGGGAACAGAT

GluGlnLeuIleAsnGlnArgIleGluGluPheAlaArgAsnGlnAlaIleSerArgLeuGluGlyLeuSerAsnLeuTyrGlnIleTyrAlaGluSerPheArgGluTrpGluAlaAsp

370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480

CCTACTAATCCAGCATTAAGAGAAGAGATGCTGATTCAATCAATGACATGAACAGTCCCTTACAACCGCTATTCTCTTTTTCAGTTCAAAATTTATCAAGTCTCTCTTTTATCAGTA

ProThrAsnProAlaLeuArgGluGluMetArgIleGlnPheAsnAspMetAsnSerAlaLeuThrThrAlaIleProLeuPheAlaValGlnAsnTyrGlnValProLeuLeuSerVal

490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

TATGTTCAAGCTGCAATTTAGATTTATCAGTTTGGAGATGTTTCACTGTTTGGCAAAAGGTGGGGATTGATGCCGCACTCAATAGTCTGTTATAATGATTAACTAGGCTTATT

TyrValGlnAlaAlaAsnLeuHisLeuSerValLeuArgAspValSerValPheGlyGlnArgTrpGlyPheAspAlaAlaThrIleAsnSerArgTyrAsnAspLeuThrArgLeuIle

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720

GGCACTATACAGATCATGCTGTACGCTGGTACAATACGGGATTAGAGCGTGTATGGGACCGGATTCTAGAGATTGGATAAGATATAATCAATTTAGAGAGAATTAACACTAACTGTA

GlyAsnTyrThrAspHisAlaValArgTrpTyrAsnThrGlyLeuGluArgValTrpGlyProAspSerArgAspTrpIleArgTyrAsnGlnPheArgArgGluLeuThrLeuThrVal

730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840

TTAGATATCGTTTCTTATTTCCGAACATATGATAGTAGAAGCTATCCAATTCGAACAGTTTCCCAATTAAACAGAGAAATTTATACAAACCCAGTATTAGAAATTTTGGTGGTATT

LeuAspIleValSerLeuPheProAsnTyrAspSerArgThrTyrProIleArgThrValSerGlnLeuThrArgGluIleTyrThrAsnProValLeuGluAsnPheAspGlySerPhe

850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960

CGTGCTCTGGCTCAGGCAATAGAGGAAGTATTAGGAGTCCACATTTGATGGATATCTTAAACAGTATAACCTCTATACGGATGCTCATAGAGGAGAAATTTATGGTCAGGGCATTCAA

ArgAlaGluAlaGlnGlyIleGluGlySerIleArgSerProHisLeuMetAspIleLeuAsnSerIleThrIleTyrThrAspAlaHisArgGlyGluTyrTyrTrpSerGlyHisGln

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080

ATAATGGCTTCTCTGTAGGGTTTTCGGGGCCAGAATTCACCTTTCCCTCTATGGAACATGCGAATGCGAGTCCCAACAACGATTTGTTGCTCAACTAGTCCAGGGCGTGTATAGA

IleMetAlaSerProValGlyPheSerGlyProGluPheThrPheProLeuTyrGlyThrMetGlyAsnAlaAlaProGlnGlnArgIleValAlaGlnLeuGlyGlnGlyValTyrArg

1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200

ACATTATCGTCCATTTATATAGAAGCCTTTAATATAGGGATAAATAACACAACTATCTGTTCTTACGGGACAGAAATTTGCTTATGGAACCTCTCAAAATTTGCCATCCCGCTGTA

ThrLeuSerSerThrLeuTyrArgArgProPheAsnIleGlyIleAsnAsnGlnGlnLeuSerValLeuAspGlyThrGluPheAlaTyrGlyThrSerSerAsnLeuProSerAlaVal

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320

TACAGAAAAGCGGAGCGTAGATTCGCTGGATGAATACCGCCACAGATAAACAACCTGCCACCTAGGCAAGGATTAGTCATCGATTAAAGCCATGTTCAATGTTTCGTTACGGCTTT

TyrArgGlySerGlyThrValAspSerLeuAspGluIleProProGlnAsnAsnValProProArgGlnGlyPheSerHisArgLeuSerHisValSerMetPheArgSerGlyPhe

第5図 (その2)

1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440

AGTAATAGTAGTGAATATAAAGAGCTCCTATGTTCTTGGATACATCGTAGTGAATTTAATAATATAATTCCTTCATCACAATACACAATACCTTTAAACAAATCTACT

SerAsnSerSerValSerIleIleArgAlaProMetPheSerTrpIleHisArgSerAlaGluPheAsnAsnIleIleProSerSerGlnIleThrGlnIleProLeuThrLysSerThr

1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560

AATCTTGGCTCTGGAATCTTGTCTGTTAAAGGACCAAGATTACAGGAGGAGATATCTTCCGAAGAATTCACCTGGCCAGATTTCACCTTAAGAGTAAATATTACTGCACCATTA

AsnLeuGlySerGlyThrSerValValLysGlyProGlyPheThrGlyGlyAspIleLeuArgArgThrSerProGlyGlnIleSerThrLeuArgValAsnIleThrAlaProLeuSer

1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680

CAAAGATATCGGGTAAGAAATTCGCTACGCTTCTACCAAAATTTACAAATTCACATACATCAATGACCGAAGACCTATTAATCAGGGGAAATTTTCAGCAACTAGTATGAGTAGGGAGTAAT

GlnArgTyrArgValArgIleArgTyrAlaSerThrThrAsnLeuGlnPheHisThrSerIleAspGlyArgProIleAsnGlnGlyAsnPheSerAlaThrMetSerSerGlySerAsn

1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800

TTACAGTCCGGAGAGCTTTAGGACTGTAGGTTTACTACTCCGTTTAACTTTTCAATGGATCAAGTGTATTTACGTTAAGTGTCTATGCTTCAATTCAGGCAATGAAGTTTATATAGAT

LeuGlnSerGlySerPheArgThrValGlyPheThrThrProPheAsnPheSerAsnGlySerSerValPheThrLeuSerAlaHisValPheAsnSerGlyAsnGluValTyrIleAsp

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920

CGAATTGAATTTGTTCCGGCAGAAATTCGCTTACGAGCAATATGATTAGAAAGACACAAAGCGGTGAATGACCTGTTTACTTCTTCAATCAAAATTCGGGTAAACACAGATGTG

ArgIleGluPheValProAlaGluValThrPheGluAlaGluTyrAspLeuGluArgAlaGlnLysAlaValAsnGluLeuPheThrSerSerAsnGlnIleGlyLeuLysThrAspVal

1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040

ACGGATTATCATATTGATCAAGTATCCAAATTTAGTTGAGTGTATTTCTGATGAATTTTGTGCGATGAAAAAAGAAATTTGCGGAGAACTCAACATCGGAGCGCATTTAGTGATGAG

ThrAspTyrHisIleAspGlnValSerAsnLeuValGluCysLeuSerAspGluPheCysLeuAspGluLysLysGluLeuSerGluLysValLysHisAlaLysArgLeuSerAspGlu

2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160

CGGAATTTACTTCAAGATCCAACTTTAGAGGGATCAATAGACAACTAGACCGTGGCTGGAGAGGAATACGGATATTACCATCAAGGAGCGGATGACGATTCAAAGAAATTTACGTT

ArgAsnLeuLeuGlnAspProAsnPheArgGlyIleAsnArgGlnLeuAspArgGlyTrpArgGlySerThrAspIleThrIleGlnGlyGlyAspAspValPheLysLeuAsnTyrVal

2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280

ACGCTATTGGGTACCTTTGATGAGTGTATCCAACTTATATATCAAAAAATAGATGAGTCGAAATTTAAAGCCTATACCCGTTACCAATTAAGAGGGTATATCGAAGATAGTCAAGAC

ThrLeuLeuGlyThrPheAspGluCysTyrProThrTyrLeuTyrGlnLysIleAspGluSerLysLeuLysAlaTyrThrArgTyrGlnLeuArgGlyTyrIleGluAspSerGlnAsp

2290 2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400

TTAGAAATCTATTAAATTCGCTACAATGCCAACACAGAAATGTGCCAGTACCGGTTCTTATGGCCGCTTTACGCCCAAGTCCCAATCGGAAAAATGTGCCCATCATCCCAT

LeuGluIleTyrLeuIleArgTyrAsnAlaLysHisGluThrValAsnValProGlyThrGlySerLeuTrpProLeuSerAlaProSerProIleGlyLysCysAlaLysHisSerHis

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520

CATTTCTCCCTGGCAATGTTGGATGTACAGACTTAAATGAGGACTTAGTGTATGGTGATTTCAAGATTAAAGCGCAAGATGGCCATGCAAGACTAGGAAATCTAGAAATTTCTC

HisPheSerLeuAspIleAspValGlyCysThrAspLeuAsnGluAspLeuGlyValTrpValIlePheLysIleLysThrGlnAspGlyHisAlaLeuGlyAsnLeuGluPheLeu

2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640

GAAGAGAACCATTTAGTAGGAGACACTAGCTCTGTGAAAAGAGCCAGAAAAATGGAGAGACAAACGTTGAAATTTGGAATGGGAAACAAATATTGTTTAAAGAGGCAAAAGAA

GluGluLysProLeuValIleGlyGluAlaLeuAlaArgValLysArgAlaGluLysLysTrpArgAspLysArgGluLysLeuGluTrpGlnThrAsnIleValTyrLysGluAlaLysGlu

2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730 2740 2750 2760

TCTGTAGATGCTTTATTTGTAACCTCTCAATATGATAGATTACAAGCGGATACCAACCTCGCGATGATTCATGCCGAGATAAAGCGCTCATAGCATTCGAGAGCTTATCTGCTCAG

SerValAspAlaLeuPheValAsnSerGlnTyrAspArgLeuGlnAlaAspThrAsnIleAlaMetIleHisAlaAlaAspLysArgValHisSerIleArgGluAlaTyrLeuProGlu

第5図 (その3)

```

2770      2780      2790      2800      2810      2820      2830      2840      2850      2860      2870      2880
CTGCTGTGATTCCGGGTGTCAATGCGGCTATTTTGAAGAATTAGAAGGGCGTATTTTCACTGCATTCTCCCTATATGATGCGAGAAATGTCATTAATAATGGC
LeuSerValIleProGlyValAsnAlaAlaIlePheGluGluLeuGluGlyArgIlePheThrAlaPheSerLeuTyrAspAlaArgAsnValIleLysAsnGlyAspPheAsnAsnGly

2890      2900      2910      2920      2930      2940      2950      2960      2970      2980      2990      3000
TTATCCTGCTGGAACGTGAAAGGGCATGTAGATGTAGAAGAACAAACAACACGTTCCGTCCTTGTGTTCCGGAATGGGAAGCAGAAGTGTCAAGAAGTTCGTGTCTCCGGT
LeuSerCysTrpAsnValLysGlyIleValAspValGluGluGlnAsnAsnGlnArgSerValLeuValValProGluTrpGluAlaGluValSerGlnGluValArgValCysProGly

3010      3020      3030      3040      3050      3060      3070      3080      3090      3100      3110      3120
CGTGGCTATATCCTTCTGTACAGCGTACAAGGAGGATATGGAGAAGGTTGCGTAACCATTCATGAGATCGAGAACAATACAGACGAACTGAAGTTTAGCAACTTTGTAGAAGAGGAA
ArgGlyTyrIleLeuArgValThrAlaTyrLysGluGlyTyrGlyGluGlyCysValThrIleHisGluIleGluAsnAsnThrAspGluLeuLysPheSerAsnPheValGluGluGlu

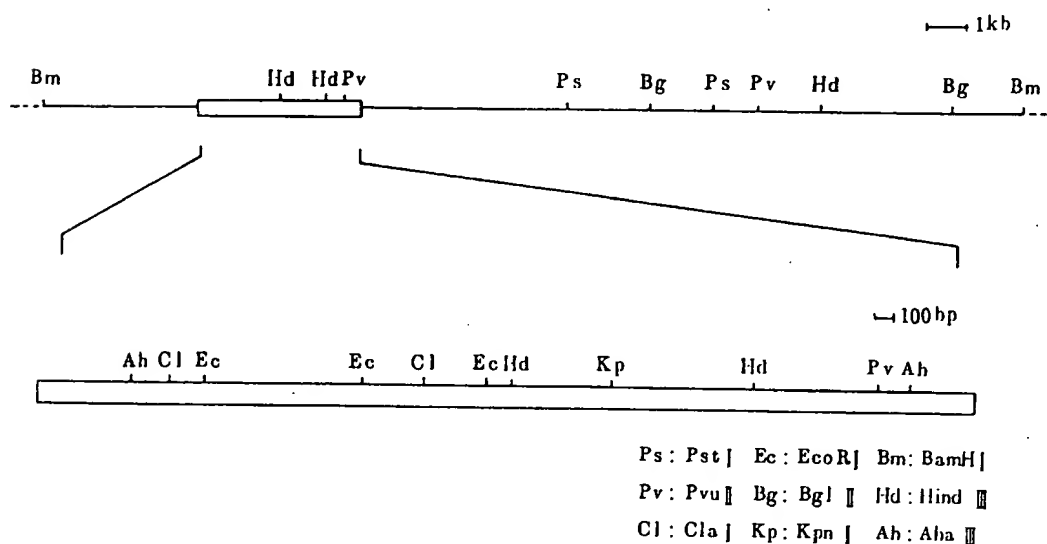
3130      3140      3150      3160      3170      3180      3190      3200      3210      3220      3230      3240
GTATATCCAAACAACCGCTAAGTGTATGATTACTCCGACTCAAGAAGAATATGAGGCTACGTACACTTCTCGTAATCGAGGATATGACGGAGCCTATGAAAGCAATTCTTCTGTA
ValTyrProAsnAsnThrValThrCysAsnAspTyrThrAlaThrGlnGluGluTyrGluGlyThrTyrThrSerArgAsnArgGlyTyrAspGlyAlaTyrGluSerAsnSerSerVal

3250      3260      3270      3280      3290      3300      3310      3320      3330      3340      3350      3360
CCAGCTGATTATGCATCAGCCTATGAAGAAAAGCATATACAGATGGACGAAGAGACAATCCTTGTGAATCTAACAGAGGATATGGGGATTACACACCACTACCAGCTGGCTATGTGACA
ProAlaAspTyrAlaSerAlaTyrGluGluLysAlaTyrThrAspGlyArgArgAspAsnProCysGluSerAsnArgGlyTyrGlyAspTyrThrProLeuProAlaGlyTyrValThr

3370      3380      3390      3400      3410      3420      3430      3440      3450      3460      3470      3480
AAAGAATTAGAGTACTTCCAGAAACCGATAAGGTATGGATTGAGATCGGAGAAACGGAAGGAACATTCATCGTGGACAGCGTGAATTACTTCTTATGGAGGAATAATATATGCTTTAA
LysGluLeuGluTyrPheProGluThrAspLysValTyrIleGluIleGlyGluThrGluGlyThrPheIleValAspSerValGluLeuLeuLeuMetGluGlu***

```

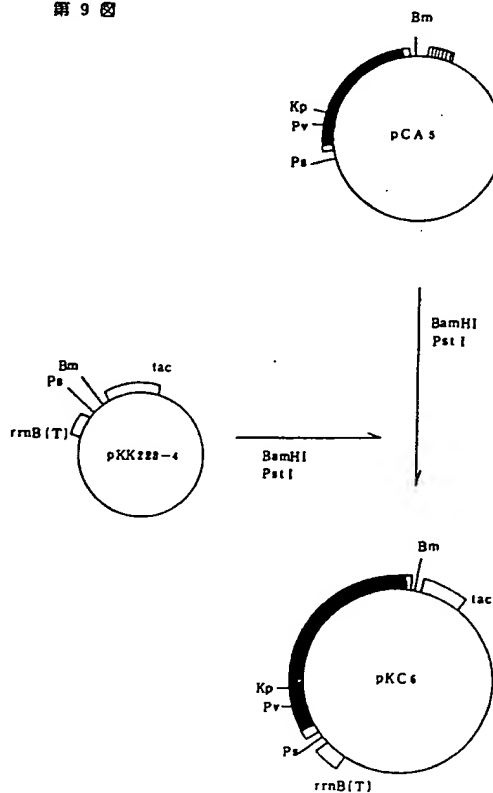
第6図



第8図 (その3)

2290 2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 GAAATCTATTAAATTCGCTACAATGCAAAACATGAAACAGTAAATGTGCCAGGTACGGGTTCCTTATGGCCGCTTTCAGCCCAAAGTCCAATCGGAAAGTGTGGAGAGCCGAATCGATGC
 GluIleTyrLeuIleArgTyrAsnAlaLysHisGluThrValAsnValProGlyThrGlySerLeuTrpProLeuSerAlaGlnSerProIleGlyLysCysGlyGluProAsnArgCys
 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520
 GCCCACACCTTGAATGGAATCCTGACTTAGATTGTTCTGTAGGGATGGAGAAAGTGTGCCCATCATTCCGATCATTCTCCTTAGACATTGATGTAGGATGTACAGACTTAAATGAG
 AlaProHisLeuGluTrpAsnProAspLeuAspCysSerCysArgAspGlyGluLysCysAlaHisHisSerHisHisPheSerLeuAspIleAspValGlyCysThrAspLeuAsnGlu
 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640
 GACCTAGGTGTATGGGTGATCTTAAAGATTAAAGACGCAAGATGGGCACGCAAGACTAGCGAATCTAGAGTTTCTCGAAGAGAAACATTAGTAGGAGAAGCGCTAGCTCGTGTGAAAGA
 AspLeuGlyValTrpValIlePheLysIleLysThrGlnAspGlyHisAlaArgLeuGlyAsnLeuGluPheLeuGluGluLysProLeuValGlyGluAlaLeuAlaArgValLysArg
 2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730 2740 2750 2760
 CGGAGAAAAATGGAGAGACAAACGTGAAAAATGGAAATGGGAAACAAATATCGTTTATAAAGAGGCAAAAGAAATCTGTAGATGCTTTATTGTAACTCTCAATATGATCAATTACAA
 AlaGluLysLysTrpArgAspLysArgGluLysLeuGluTrpGluThrAsnIleValTyrLysGluAlaLysGluSerValAspAlaLeuPheValAsnSerGlnTyrAspGlnLeuGln
 2770 2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880
 CGCGATACGAATATGGCATGATTTCATGCGCAGATAAAGCTGTTATAGCAATTCGAGAACTTATCTGCTGAGCTGTCTGTGATTCCGGGTGTCAATGCCGGCTATTTTGAAGAATTA
 AlaAspThrAsnIleAlaMetIleHisAlaAlaAspLysArgValHisSerIleArgGluAlaTyrLeuProGluLeuSerValIleProGlyValAsnAlaAlaIlePheGluGluLeu
 2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000
 GAAAGGCGTATTTTCACTGCTTCTCCCTATATGATCGGAGAAATGTCAATTAATAATGGCTTATCCTGCTGGAACGTGAAAGGGCATGTAGATGTAGAGAACA
 GluGlyArgIlePheThrAlaPheSerLeuTyrAspAlaArgAsnValIleLysAsnGlyAspPheAsnAsnGlyLeuSerCysTrpAsnValLysGlyHisValAspValGluGluGln
 3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120
 AACAAACACGCTTCGGTCTTGTGTTCCGGAATGGGAAGCAGAAGTGTCAAGAAGTTCGTGTCTGTCCGGGTCTGGCTATATCCTTCGTTCACAGCGTACAAGGAGGGATATGGA
 AsnAsnGlnArgSerValLeuValValProGluTrpGluAlaGluValSerGlnGluValArgValCysProGlyArgGlyTyrIleLeuArgValThrAlaTyrLysGluGlyTyrGly
 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240
 GAAGGTTCGCTAACCATTCATGAGATCGAGAACATACAGACGAATGAAGTTTACGAAGTTCGCTAGAGAGGAAATCTATCCAAATACACGGTAACGTGTAATGATTACTGTAAT
 GluGlyCysValThrIleHisGluIleGluAsnAsnThrAspGluLeuLysPheSerAsnCysValGluGluGluIleTyrProAsnAsnThrValThrCysAsnAspTyrThrValAsn
 3250 3260 3270 3280 3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360
 CAAGAAGAATACGGAGGTGCTACACTTCGTAATCGAGGATATAACGAAGCTCTTCCGTACCAGCTGATTATGCTCAGTCTATGAAGAAAAATCGTATACAGATGGACGAAGAGAG
 GlnGluGluTyrGlyGlyAlaTyrThrSerArgAsnArgGlyTyrAsnGluAlaProSerValProAlaAspTyrAlaSerValTyrGluGluLysSerTyrThrAspGlyArgArgGlu
 3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480
 ATCCTTGTGTAATTAACAGAGGGTATAGGATTACAGCCACTACCACTTGCTTATGTGCAAAAAGAAATAGAATACTTCCCAAAAACCGATAAGGTATGGATTGAGATTGGAGAAACG
 AsnProCysGluPheAsnArgGlyTyrArgAspTyrThrProLeuProValGlyTyrValThrLysGluLeuGluTyrPheProGluThrAspLysValTrpIleGluIleGlyGluThr
 3490 3500 3510 3520 3530 3540 3550
 GAAGGAACATTTATCGTGGACAGCGTGAATTAATCTCTTATGGAGGAATAGTCTCATGCAAACTCAGGTTT
 GluGlyThrPheIleValAspSerValGluLeuLeuMetGluGlu***

第9図



第 1 頁の続き

⑤Int. Cl. 4	識別記号	庁内整理番号
C 12 P 21/02		6712-4B
//(C 12 P 21/02		
C 12 R 1:19)		

⑫発 明 者	高 田	容 司	兵庫県宝塚市高司 4 丁目 2 番 1 号 住友化学工業株式会社 内
⑫発 明 者	中 山	勇	兵庫県宝塚市高司 4 丁目 2 番 1 号 住友化学工業株式会社 内
⑫発 明 者	大 川	秀 郎	兵庫県宝塚市高司 4 丁目 2 番 1 号 住友化学工業株式会社 内